はじめてシリーズ 2

はじめての抗体標識プロトコル

～カスタマーサポートの視点から～

DOJINDO

目　次

I. はじめに

イムノアッセイは、免疫反応を利用して、微量物質の検出・定量を行う手法で、特異性が高く高感度な分析方法である。酵素免疫測定法（EIA: enzyme-immuno assay)、免疫染色法、イムノブロッティングなど応用の幅も広い。ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) は、EIA の中でも特によく用いられる手法である。これらの手法は、酵素反応や蛍光検出系を組み合わせることで、従来の手法でよく用いられた放射性物質を用いる必要がなく、取り扱いの制約や危険性も低い検出系として、よく利用されている。

抗原と結合したモノクローナル抗体やポリクローナル抗体（一次抗体）を検出するには、標識された二次抗体を使用するのが一般的である。ビオチン、酵素、蛍光色素などが標識された二次抗体は、市販されていることが多く、使用者が使用する一次抗体に適した二次抗体を用いれば、吸光、蛍光、発光などの検出に応じた系を選択することが可能である。

一方、酵素やビオチンなどを一次抗体に直接標識することが可能であれば、実験手順は簡略化され、さらに多重染色への発展、二次抗体の影響の回避など多くの利点がある。それにもかかわらず、一次抗体への直接標識法が広く普及していない背景には、標識操作の煩雑さや得られる標識抗体の活性低下などの問題点がある。抗体に直接標識する技術は研究室によっては実施しにくく敬遠される場合も多い[1)]。

しかし、特異性や活性を損なうことなく抗体へ直接標識することが簡便化されれば、先に述べたような利点を生かすことができる。また、抗体以外のタンパク質を同様に標識することができれば、この手法はタンパク質が関与する相互作用の解析など応用が可能である。

本誌では、小社のキットの原理を中心に、抗体の特異性を失うことなく抗体へ酵素（タンパク質）を簡便に標識できる方法や、その実験例などを初心者の方にも分かりやすくご紹介したい。

II. イムノアッセイの各手法の利点と欠点

1. 直接法：一次抗体に直接、蛍光色素や酵素を標識する方法。

2. 間接法：蛍光色素や酵素が標識された二次抗体を用いて、特異的に一次抗体を検出する方法。

3. 増感法：一次抗体（もしくは二次抗体）をビオチン化しておき、ビオチン - アビジン複合体を形成させて、検出する方法（ABC 法）がその一例である。蛍光物質や酵素で標識されたアビジン（もしくはストレプトアビジン）を用いることによって、検出感度が上昇する。

表 1　各手法の利点と欠点

手法	利点	欠点
直接法	• 実験手順を簡略化することができる。 • 多重染色を行う際、抗体の種を選ばなくても良い。 • 二次抗体の影響を回避することができる。	• 直接標識する手間が発生する。 • 標識操作によって、抗体活性を失活させる可能性がある。
間接法	• 特異的一次抗体を検出するために標識二次抗体を統一して使用でき、汎用性が高い。 • 一次抗体に対して複数の二次抗体が反応するため、より増強されたシグナルが得られる。	• 二次抗体による非特異結合が生じる可能性がある。 • 多重染色を行う際、抗体の種を選択する必要がある。 • 目的とする標識二次抗体が販売されていないことがある。
増感法（主に ABC 法について）	• 特異的一次抗体をビオチン化しておけば、状況に 応じて検出系を選択でき、汎用性が高い。 • ビオチンは低分子であるので、抗体に複数個標識ができ高感度検出が可能である。	• 内因性ビオチンなどによる疑陽性化に注意が必要である。

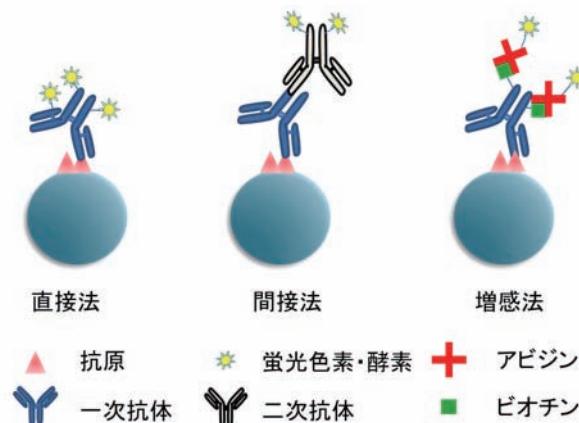



図 1　各手法の模式図

III. 何を標識するのか

測定方法に応じて、標識分子の種類は異なる。主な標識分子の種類を以下に示す。

表 2 各分析法における標識の種類

分析方法	標識分子の種類
ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)	酵素標識 HRP(ペルオキシダーゼ) や ALP(アルカリホスファターゼ) など ビオチン標識※1
組織・細胞の免疫染色 ウエスタンブロッティング	酵素標識（HRP, ALP） 蛍光色素標識または、蛍光タンパク質標識※2 ビオチン標識※1
フローサイトメトリー	蛍光色素標識または、蛍光タンパク質標識※3 ビオチン標識※1
in vivo イメージング	近赤外蛍光色素（ICG など）

※1　酵素標識または蛍光標識アビジン（またはストレプトアビジン）が必要である。

※2　蛍光タンパク質は、測定対象波長域のフィルターへの蛍光の漏れ込みが起こりやすい為、多重染色を行う場合には蛍光色素の使用をお勧めする。

※3　蛍光タンパク質類は、蛍光色素に比べて蛍光強度が強く、蛍光波長が広いことからフローサイトメトリーで多く使用されている。フローサイトメトリーで多重染色を行う場合、装置の蛍光漏れ込み補正（コンペンセーション）を実施することで、蛍光タンパク質の蛍光の漏れ込みを改善できる。

IV. 抗体のどこに標識するのか

1. 抗体の基本構造

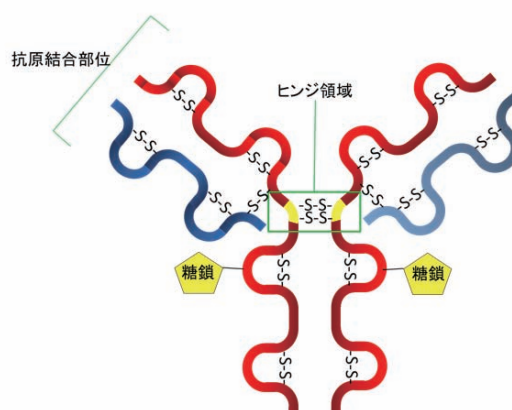



図 2　抗体の基本構造

IgG 抗体は同数の H 鎖 (50kDa：赤) と L 鎖 (20 ～ 25kDa：青) がそれぞれ 2 本ずつジスルフィド結合 (S-S 結合) しており、Y 字型の対称構造を呈している。

2. 標識対象の官能基

アミノ基（$-NH_2$）は一般的なタンパク質や抗体には数多く存在するので、標識に利用しやすい。ただし、アスパラギンやグルタミン、アルギニンの側鎖のアミノ基は、アミド基、グアニジル基の一部で反応性が低く、標識の対象とはならない。抗体のアミノ基の中で反応性が高いのは、リシン残基の側鎖アミノ基とタンパク質 N 末端アミノ基であり、この部分が標識の対象となる（図 3）。

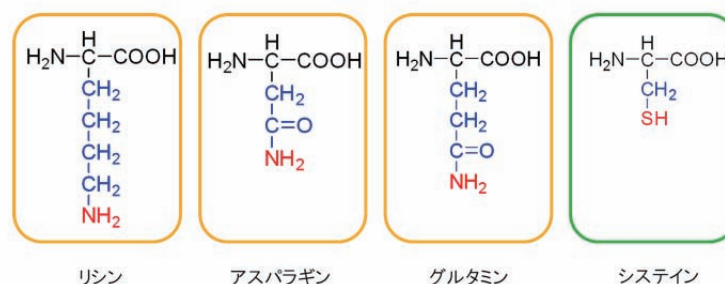



図 3　各種アミノ酸の構造式

一方、スルフヒドリル基（-SH）はシステイン残基の側鎖の一部である。ただし、抗体中のシステイン残基はジスルフィド結合（-S-S-）を形成し、高次構造を保つのに利用されているので、そのまま標識に利用することは難しい。そのために、還元剤を用いてジスルフィド結合を還元し、SH 基として標識に使用する。ただし、抗体やタンパク質中のすべてのジスルフィド結合を還元すると、タンパク質の機能が失われる可能性があるので、一部のジスルフィド結合のみを還元し、機能を保持したまま標識部位として利用する。
この他にも、抗体の糖鎖を酸化してアルデヒド基（-CHO）を生成し、シッフ塩基結合によって標識に利用する方法もある。

V. どのようにして標識するのか

1. 抗体への低分子（蛍光色素、ビオチンなど）の標識方法

前述の通り、抗体への標識にはアミノ基（$-NH_2$）が利用されることが多い。例えば、ビオチンを標識する場合は、ビオチン分子にアミノ基と反応する活性エステルを導入した化合物を使用する。アミノ基反応性活性エステルとしては、一般に *N*- ヒドロキシスクシンイミド活性エステル（NHS エステル）が用いられる。NHS エステルは、一級アミンと pH8 付近で効率よく反応し、安定なアミド結合を形成する。pH7 付近では、アミノ基がプロトン化している割合が高く（$-NH_3^+$ の構造をとっている）、反応性が低い（求核性が弱い）。一方、pH9 以上では、アミノ基のプロトン化の割合は低くなるが、NHS エステル自身の加水分解が進みやすく、反応効率が低くなる。

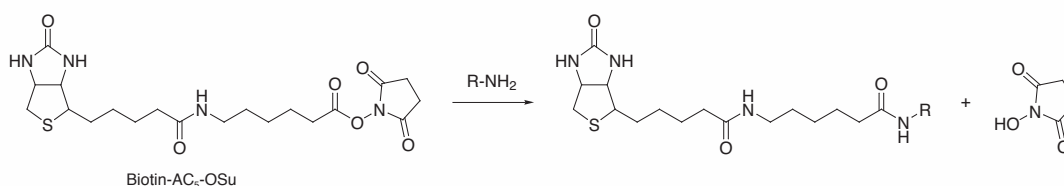



図 4　NHS エステルと一級アミノ基の反応

また、SH 基を標識に利用する場合は、マレイミド基を導入した低分子を使用する。マレイミド基は、抗体標識に適した以下の利点を有する [2)]。

1) 反応条件が温和で、かつ反応収率も高い。
2) 反応が SH 基選択的で、中性 pH 付近ではアミノ基に比べ約 1,000 倍速く反応する。
3) マレイミド基と SH 基の反応により形成された結合は安定である。

ただし、マレイミド基は加水分解されやすいので、必ず中性 pH 付近で反応を行い、pH を上げることは極力避けた方がよい。SH 基とマレイミド基との反応は pH6 ～ 7 で十分に進行する。

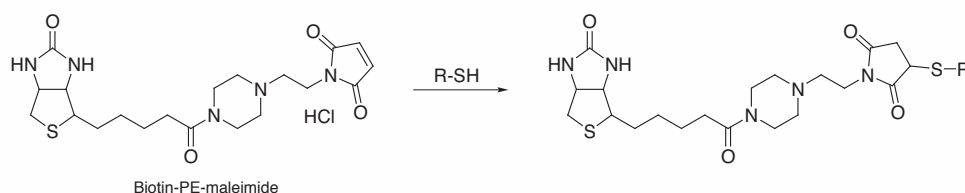
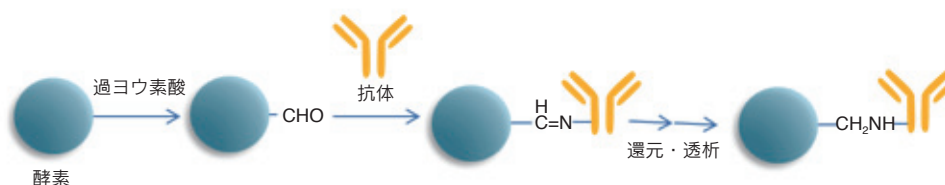
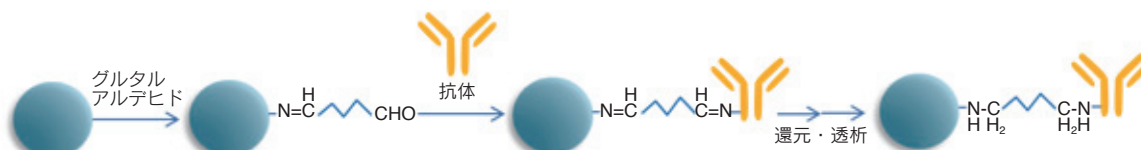



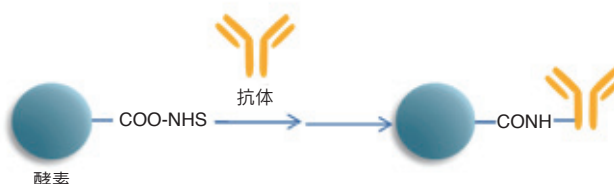
図 5　マレイミド基と SH 基の反応

2. 抗体へのタンパク質の標識方法　～高分子標識の難しさ～

低分子である蛍光色素やビオチンの抗体への標識は、前述の活性エステルを導入した試薬を用いれば、比較的容易に行える。しかし、酵素や蛍光タンパク質などの高分子を抗体に標識するのは、低分子標識とは異なった技術が要求される。特に、アミノ基を利用する方法は、標識する酵素や蛍光タンパク質の活性を保つ温和な条件で反応させる必要がある。さらに、抗体と同様に、酵素や蛍光タンパク質にもアミノ基が多数存在するので、酵素や蛍光タンパク質自身が重合するのを避けなければならない。そのために、後に述べる 1) 過ヨウ素酸法や 2) グルタルアルデヒド法は、抗体標識の経験がない研究者にとっては、実施しにくい方法である。これを改善するために、標識したい酵素や蛍光タンパク質が持つアミノ基と二価性試薬を反応させてマレイミド基を導入し、抗体のジスルフィド結合を還元して得られる SH 基と反応させる 3) マレイミド法が有効とされている。
　小社では、抗体と混合するだけで酵素や蛍光タンパク質の標識抗体を得ることができる技術、4)NHS 法を開発し、キット化することに成功した。本方法は、酵素や蛍光タンパク質にアミノ基反応性の官能基を組み込んでおり、簡便に目的の抗体（タンパク質）に酵素や蛍光タンパク質を標識することが可能である。本手法が、抗体（タンパク質）を直接標識したい研究者のお役に立てれば幸いである。

1) 過ヨウ素酸法
酵素の糖鎖部分を過ヨウ素酸で酸化し、アルデヒド基を導入する。酵素のアルデヒド基と抗体のアミノ基が反応して、シッフ塩基（CH=N）が形成される。このシッフ塩基は不安定な為、C=N 二重結合を還元する必要がある。しかし、還元剤処理は酵素や抗体の活性を低下させる可能性が高く、ペルオキシダーゼ（HRP）のような比較的化学修飾に強い酵素以外には、本手法の適応は難しい[2)]。

2) グルタルアルデヒド法
酵素を過剰のグルタルアルデヒドで処理し、酵素にアルデヒド基を導入する。それ以後は、過ヨウ素酸法と同様に抗体のアミノ基と反応させ、還元剤で処理する。グルタルアルデヒドはタンパク質架橋剤、アミノ基修飾剤であるので、過剰のグルタルアルデヒド処理は、酵素の活性低下が起こる可能性が高く、注意が必要である。

3) マレイミド法
SH 基選択的な反応基としてマレイミドを有する架橋剤を用いる方法で、温和（中性 pH 域）な条件で選択的な架橋ができる。生成する結合の安定性も高く、優れた標識法である。まず、架橋剤と酵素のアミノ基を反応させて、マレイミド基を導入する。抗体は予め還元剤で処理し、抗体中のジスルフィド結合（-S-S-）を解裂して SH 基を形成させたものを使用する。ただし、還元剤は抗体のヒンジ部のジスルフィド結合のみを特異的に還元する訳ではなく、実際は抗体の様々な部分のジスルフィド結合を還元する。マレイミド導入酵素と還元処理抗体とを反応させ、標識体を得る。本手法は、後に紹介する SH 基への標識キット原理に応用されている。

また、IgG をペプシンで消化すると、Fc 部分が消化されて $F(ab')_2$ が得られる。$F(ab')_2$ は還元すると 2 つの Fab' に切り離される。Fab' は抗原結合部位の反対側のヒンジ部に SH 基を持っているので、Fab' にマレイミド法で標識することが可能である (図 17 参照)。Fab' を用いると抗体の活性を失うことなく、しかも非特異的吸着の少ない酵素標識 Fab' を得ることができるという利点がある。一方、IgG をパパインで消化すると、ヒンジ部分も消化されて SH 基を持たない Fab が得られる。Fab は SH 基がなく、マレイミド法で標識されないので、アミノ基を使った標識を行う必要がある。

4) NHS（*N*- ヒドロキシスクシンイミド）法
NHS によって酵素のカルボキシシル基を選択的に活性化する方法である。小社では、酵素自身のアミノ基をキャッピングすることにより酵素自身の重合を防ぎ、安定なアミノ基反応性活性体を得ることに成功した。さらに、反応条件を最適化することにより、酵素の劣化を最小限に抑えている。NHS で活性化した酵素と抗体を反応する方法では、酵素と抗体は安定なアミド基で結合しているので、還元の必要はなく、比較的不安定な ALP(アルカリホスファターゼ) にも適用が可能である。また、IgG 以外のタンパク質の多くはジスルフィド結合（-S-S-）によって高次構造を保っているので、還元剤の使用はタンパク質自体の機能を失う危険性を伴う。このような場合は、還元剤を使用せずに標識できる NHS 法を用いることにより、タンパク質を失活させることなく、標識体を得ることができる本手法は有効である。本手法は、後に紹介するアミノ基への標識キット原理に応用されている。

VI. どのようにして検出するのか

1. 酵素の特徴

EIA で主に用いられる酵素の特徴を以下に述べる。

表 3 酵素の特徴比較

酵素	ペルオキシダーゼ	アルカリホスファターゼ
略記	HRP（horseradish peroxidase: 西洋わさびペルオキシダーゼ） または POD（peroxidase）	ALP または AP、仔ウシ小腸由来の場合、CIAP と略記されることもある
分子量（MW）	約 40,000	約 140,000
反応	基質 +H_2O_2 → 酸化型色素 + $2H_2O$	リン酸エステル化合物を加水分解
安定性	強い	比較的弱い
至適 pH	pH6.5	pH8-10
価格	比較的安価	比較的高価
基質の選択肢	多い	少ない
阻害剤	CN^-, S_2^-, F^-, N_3^- (保存剤の NaN_3 に注意)	リン酸塩など（リン酸緩衝液の使用に注意）
選択の判断材料	免疫染色の場合、内在性ペルオキシダーゼ活性の影響を受けることがある（パラフィン包埋切片では活性阻害を受ける為使用できるが、凍結切片では使用できない）	内在性アルカリホスファターゼ活性が高い組織では CIAP 標識抗体が使用される（CIAP 以外の内在性アルカリホスファターゼ活性はレバミソールによる阻害が可能な為）

2. 主な酵素標識抗体の検出試薬

EIA では、酵素に基質を加えて生成される色素を吸光（呈色）、蛍光または化学発光などで検出する。HRP の場合は TMB や DAB、ALP の場合は *p*NPP といった基質が一般的に利用されてきたが、近年はさまざまな種類の基質やキットが各社から発売されている。検出感度は「化学発光＞蛍光＞吸光（呈色）」の順に高いと言われている。研究者自身の検出系と求める感度を基に選択していただくとよい。

表 4　各測定法に主に使用される検出基質

	酵素	発色基質	蛍光基質	化学発光基質
ELISA	HRP	・TMB (Tetramethylbenzidine)※1 ・OPD (*o*-Phenylenediamine) ・ABTS (2,2-Azinobis[3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid])	・Amplex® Red	ルミノール系 (ECL)
	ALP	・*p*NPP (*p*-Nitrophenylphosphate)	・AttoPhos® ・4-MUP (4-Methylumbelli-pheryl phosphate)	ジオキセタン系 (CDP-Star™, AMPPD®, CSPD®)
免疫染色	HRP	・DAB (3,3'-Diaminobenzidine)※1	・TSA 法 (Tyramide Signal Amplification) ・HPPA (*p*-Hydroxyphenyl propionic acid)	-
	ALP	・BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3'-indolylphos-phatase / Nitroblue tetrazolium)	-	-
ウエスタンブロッティング	HRP	・TMB ・DAB	-	ルミノール系 (ECL)
	ALP	・BCIP/NBT	・ECF ・DDAO phosphate	ジオキセタン系 (CDP-Star™, AMPPD®,CSPD®)

※1 ELISA には水溶性の発色基質である TMB がよく用いられる。DAB は非水溶性である為、ELISA にはあまり用いられない。

DOJINDO

VII. フィルトレーションチューブを利用した反応・精製

小社の Labeling Kit は活性化試薬とフィルトレーションチューブ（分子分画 30K）により抗体を簡便に標識できるように設計されている。活性化試薬は抗体（もしくは還元処理した抗体）を指定の緩衝液中で混合するだけで、抗体（もしくは還元処理した抗体）に標識することが可能である。活性化試薬は、50 ～ 200 μg の抗体を標識する量に最適化されており、標識後に残ったビオチン化試薬や蛍光色素などの低分子試薬は、遠心操作により除去することが可能である。一方、標識後に残った酵素や蛍光タンパク質などの高分子は、遠心により除去することはできないが、反応液中で活性基が加水分解されるため、その後の EIA には大きな影響を及ぼさないと考えられる。前処理 ― 反応 ― 精製までの全ての操作を一つのフィルトレーションチューブ上で行うことができ、いずれのキットを用いても概ね 3 時間以内に標識体を得ることができる。

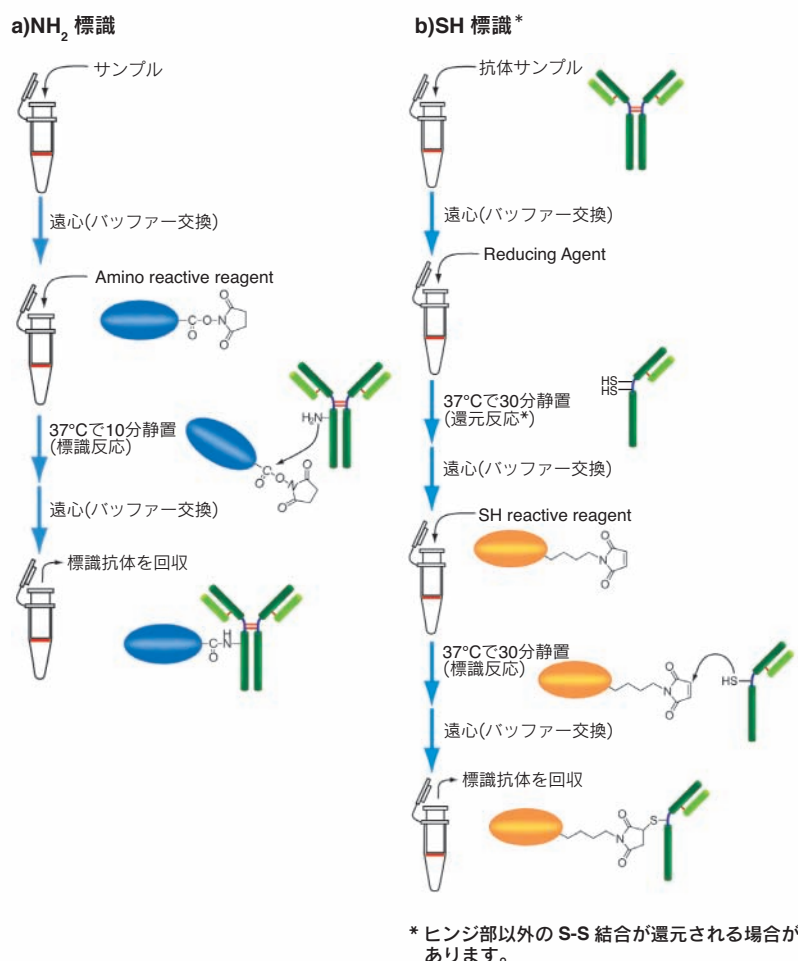



図 6　NH_2 標識と SH 標識の操作手順

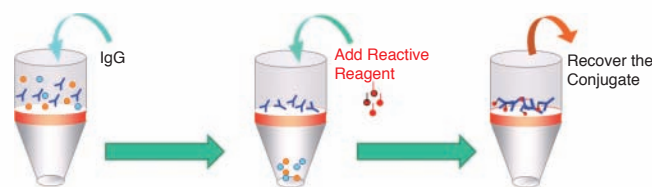



図 7　フィルトレーションチューブを利用した精製の模式図

キットで使用しているフィルトレーションチューブには、30K の分子分画を持つフィルターが装着されている。低分子は、遠心操作によりフィルターを通過するが、抗体などの高分子はフィルターを通過しない。それ故、フィルター上で簡単・迅速に反応および精製を行うことができる。

以降のページでは、小社の抗体標識キット（Labeling Kit シリーズ）を用いた標識方法、実験例および関連技術を紹介する。

VIII. 抗体へのビオチン標識方法

1. 標識方法

操作上の注意点などの詳細については、取り扱い説明書をご参照いただきたい。なお、キットの取り扱い説明書は小社 HP からダウンロードが可能である。

＜例：LK03 Biotin Labeling Kit-NH_2 取扱説明書 (一部）＞

2. 標識例

Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody(Clone#NO_2G52)　50 µg を Biotin Labeling Kit - NH_2 (Code: LK03) を用いてビオチン標識し、肺高血圧剤 (モノクロタリン) を投与したラットの肺動脈凍結切片を染色した。肺動脈近傍で 8- ニトログアノシンが検出されており、モノクロタリン投与により肺動脈周辺でひきおこされた炎症による NO 産生が示唆された。

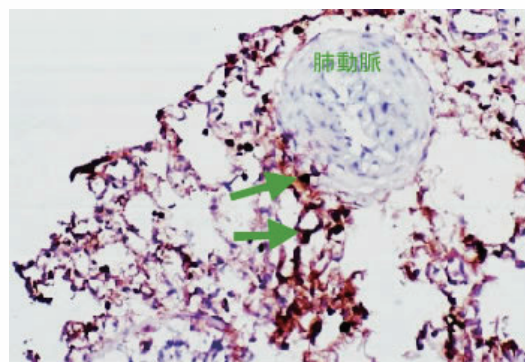



図 8　ビオチン標識 Anti-Nitroguanosine monoclonal 抗体を用いて染色した肺高血圧剤 (モノクロタリン) 投与ラット肺動脈凍結切片の組織免疫染色像 (x200, HRP 標識ストレプトアビジン/DAB 染色)
（画像提供 : 北里大学医療衛生学部微生物学教室　北里英郎先生)

3. 関連技術紹介

1) 分子量 50,000 以下のタンパク質へのビオチン標識

「Ⅶ　フィルトレーションチューブを利用した反応・精製」で前述した通り、本キットでは 30K の分画分子量を持つフィルトレーションチューブが装着されている。したがって、標識対象のタンパク質分子量は、50,000 以上と設定されている。分子量 146,000 程度の IgG 抗体を標識する場合には何ら問題ないが、分子量 50,000 以下のタンパク質のアミノ基に標識をする場合は、別途、分画分子量の小さいフィルトレーションチューブをご用意いただくことで、ビオチン標識が可能である。

＜準備するもの＞

・Biotin Labeling Kit-NH_2 (Code: LK03)
・フィルトレーションチューブ（10K ※1）　Pall 社　ナノセップ遠心ろ過デバイス（Pall 社 Code: OD010C33）
　※1 標識したいタンパク質の分子量によって、適当なものをご選択いただきたい。

＜標識方法＞

キットの取り扱い説明書に従って操作する（タンパク質量は 50 ～ 200 µg にする）。ただし、フィルトレーションチューブの分画分子量が小さくなると遠心時間が長くなる可能性があるので、液残りがある場合は遠心時間を延長する必要がある。遠心速度を上げることは、回収率の低下につながるので、お勧めしない。

IX. 抗体への酵素標識方法

1. Peroxidase Labeling Kit (HRP 標識キット)

1) 標識方法

操作上の注意点など詳細については、取り扱い説明書をご参照いただきたい。なお、キットの取り扱い説明書は小社 HP からダウンロードが可能である。

2) EIA（Enzyme Immunoassay）への応用例

EIA への応用例として、ELISA 及びウエスタンブロッティングでの使用例を紹介する。Peroxidase Labeling Kit-NH_2(Code: LK11) で標識した一次抗体を用いた直接法と、一次抗体と市販の HRP 標識二次抗体を用いた間接法をそれぞれ比較した。図 9 はビオチン化 BSA をプレートに固定し、HRP 標識抗ビオチン抗体を結合後、TMB 発色した ELISA の結果である。抗ビオチン抗体と HRP 標識二次抗体を用いた間接法と比較すると、HRP 標識一次抗体を用いた直接法はほぼ同等の感度を示した。図 10 はリン酸化チロシン BSA のウエスタンブロッティングを同様に直接法と間接法で検出した結果である。間接法に比べ、直接法は同等以上の感度を示した。一般的に、二次抗体を用いた間接法は直接法の 10 倍感度が高いと言われているが [3]、本キットで作製した標識一次抗体を用いた直接法は間接法と同等以上の感度を示し、その有用性が示唆される。

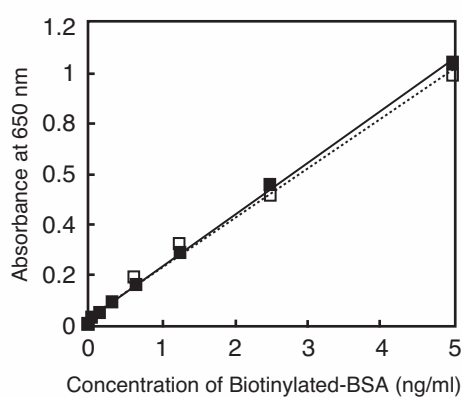



図 9　直接法及び間接法による ELISA の感度比較

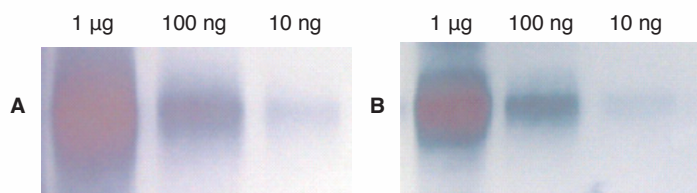



図 10　リン酸化チロシン BSA のウエスタンブロッティング (TMB 発色)
A: 直接法 (HRP 標識抗リン酸化チロシン抗体で検出）
B: 間接法 (抗リン酸化チロシン抗体と HRP 標識二次抗体で検出）

3) 関連技術紹介

(1) 発色基質調製方法

A. DAB 溶液調製法

- 9 mg の DAB（Code: D006）を 1 ml PBS に溶解し、100X DAB 溶液を調製する。
- 30% 過酸化水素 5 μl を 1 ml PBS で希釈し、200X 過酸化水素溶液を調製する。
- 10 μl の 100X DAB 溶液と 5 μl の 200X 過酸化水素溶液を 1 ml PBS で希釈し、染色溶液とする（染色溶液は保存できないので、用時調製すること）。

B. TMB 溶液調製法

- 6 mg の TMBZ(Code: T022) を 1 ml DMSO に溶解し、100X TMBZ 溶液を調製する。
- 30% 過酸化水素 5 μl を 1 ml PBS で希釈し、200X 過酸化水素溶液を調製する。
- 10 μl の 100X TMBZ 溶液と 5 μl の 200X 過酸化水素溶液を 1 ml PBS で希釈し、TMB 溶液とする。

(2) HRP 標識抗体の精製方法

酵素標識された抗体を用いて免疫染色を行った際など、未反応のペルオキシダーゼが非特異吸着の要因となることがある。その際は、小社 IgG 精製キット（Code: AP01, AP02）を用いて HRP 標識抗体を精製することによって、バックグラウンドの上昇を抑えることが期待できる。図 11 に、小社 IgG Purification Kit を用いて、精製したペルオキシダーゼ -IgG の HPLC チャートを示した。未反応のペルオキシダーゼが標識抗体溶液から分離されたことが確認できる。
ただし、本方法は安定な酵素であるペルオキシダーゼに対し可能な方法である。比較的安定性が低い酵素であるアルカリホスファターゼを標識した抗体や蛍光タンパクを標識した抗体では、アフィニティ精製時に使用される酸性溶離液の影響を受け、酵素や蛍光タンパク質が失活するので、適応できない。また、SH 標識の場合は、還元操作によって抗体の Fc 部が還元の影響を受けている可能性が高く、適応は難しいと思われる。

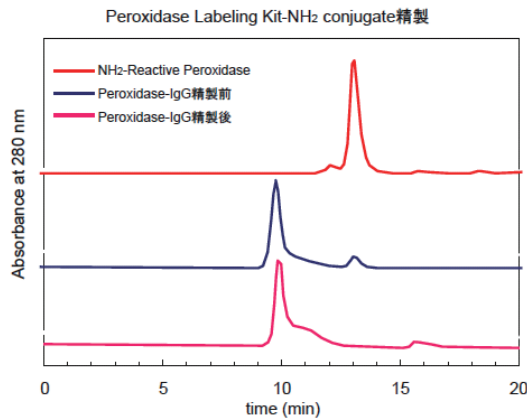



図 11　精製前後の Peroxidase-IgG の HPLC チャート
< HPLC 条件>
カラム：TSKgel G3000PWXL φ78 × 300 mm,
溶離液：100 mmol/l リン酸緩衝液 , pH 6.8,
流　速：0.5 ml/min

2. Alkaline Phosphatase Labeling Kit (ALP 標識キット)

1) 標識方法

操作上の注意点など詳細については、取り扱い説明書をご参照いただきたい。なお、キットの取り扱い説明書は小社 HP からダウンロードが可能である。

2) ELISA 例

ELISA プレートに固定化したビオチン標識 BSA を､各種方法で標識した抗ビオチン抗体を用いて検出感度を比較した（図 12）。Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH（Code: LK13）を用いて標識した抗体は、アミノ基を対象に標識した抗体や他社キットを用いて作製した ALP 標識抗ビオチン抗体と比較しても、より高感度の検出が可能であることが分かる。

　アミノ基標識より SH 標識の方がより高感度の検出が可能である理由としては、ALP の分子量が大きいので抗体認識部位近くのアミノ基に標識された ALP が抗体認識機能に阻害を起こしているためと考えられる。

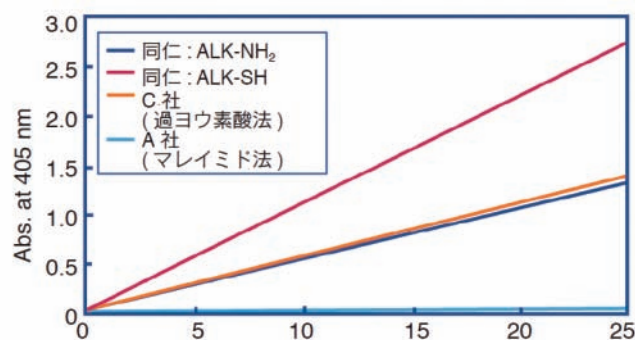



図 12　ELISA 実験例

X. 抗体への蛍光色素標識方法

1. 蛍光色素を用いた多重染色の問題点

多重染色法は､同一の試料で複数の分子を同時に検出しその局在を比較することができるという有用な手法である｡励起･蛍光波長の異なる二種類以上の蛍光色素を使用すれば、モノクロ CCD カメラや共焦点レーザー顕微鏡などで蛍光をデジタルデータとして取り込んだ後、緑、赤、青の擬似カラーを付けた画像を重ね合わせる（マージする）ことも可能である。

　ただし、多重染色を間接法で行う場合は、二次抗体の非特異的な吸着を防止するために以下のことに注意しなければならない。

1) 一次抗体として同一の動物種で作製したものを同時に使用できない（図 **A**)。
2) 二次抗体は一次抗体を作製した動物とは別種の動物で作られたものを用意しなければならない（図 **A**, **B**)。
3) 二次抗体は多重染色用のもの（交差反応 ※1 を防ぐために他の動物の血清で吸着処理 ※2 したもの）を使用しなければならない (図 **C**, **D**)。
4) サンプルの細胞腫と同一の動物種で作製した一次抗体は、使用できない（図 **E**, **F**)。

※ 1 交差反応とは
　二次抗体は一次抗体のホスト動物種に反応する抗体を選ぶが、その二次抗体が他の動物種に対しても多少反応してしまう。これを交差反応と呼ぶ。交差反応の影響を抑える方法の一つとして、吸着処理という方法がある。

※ 2 吸着処理とは
　予め交差反応を示す可能性のある動物の血清を固定化したビーズを充填したカラムに二次抗体溶液を添加し、それらの血清と反応する抗体をあらかじめ除く処理のこと。

多重染色の場合、一次抗体として同一の動物種で作製したものを同時に使用できない！
二次抗体も一次抗体を作製した動物種とは別種の動物で作られたものを用意する必要がある。

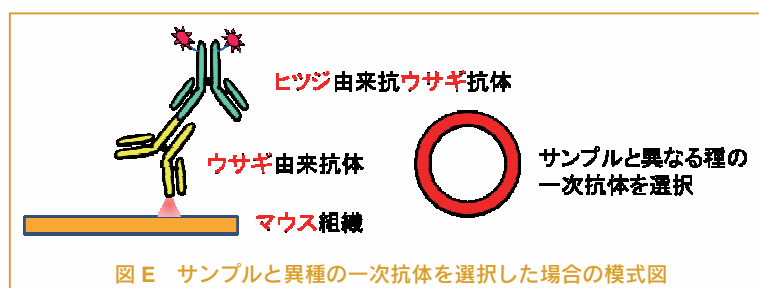
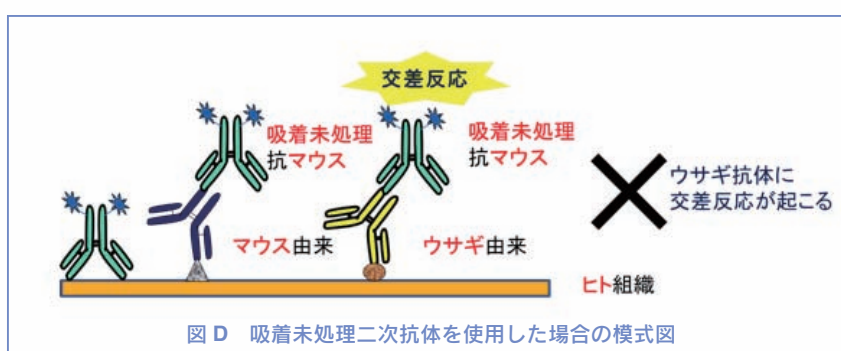
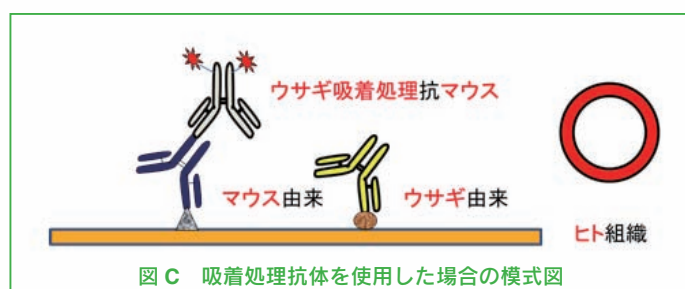
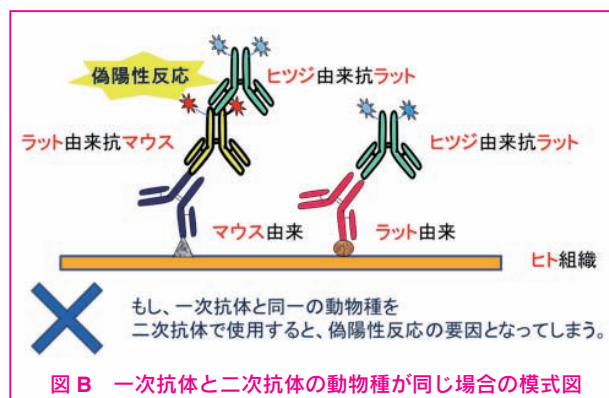
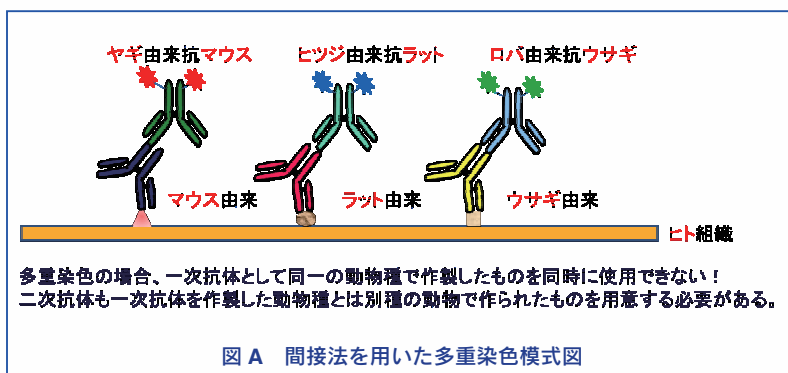
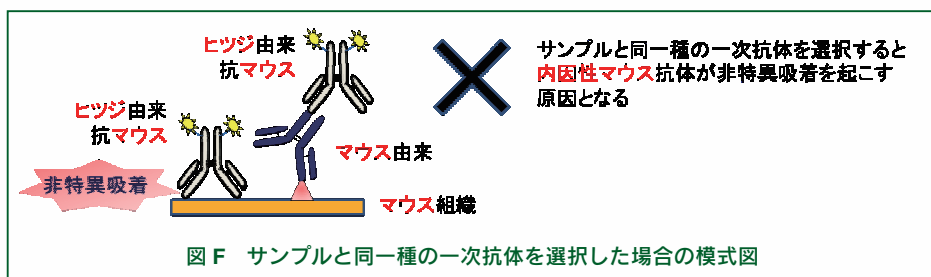
図 A　間接法を用いた多重染色模式図

図 B　一次抗体と二次抗体の動物種が同じ場合の模式図

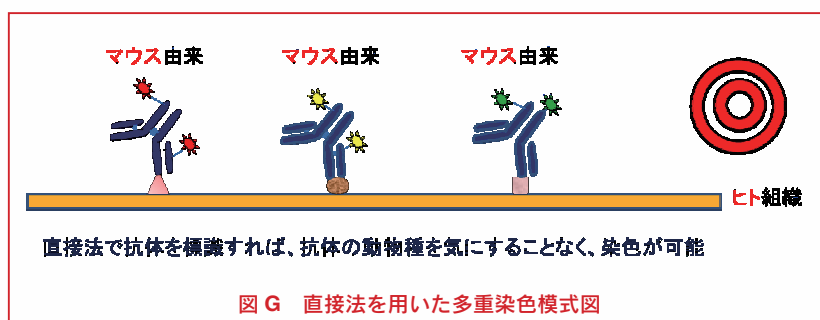
図 C　吸着処理抗体を使用した場合の模式図

図 D　吸着未処理二次抗体を使用した場合の模式図

図 E　サンプルと異種の一次抗体を選択した場合の模式図

図 F　サンプルと同一種の一次抗体を選択した場合の模式図

2. 多重染色における直接法の利点

上記のような間接法同時染色の問題点は、多重染色を別々に行う手法やブロッキング剤を用いて解決する方法もあるが、直接標識法を用いれば簡単に解決することが可能である（図 G）。また、操作数も格段に減るので、手間も簡素化することができるし、二次抗体の影響も回避できる。

図 G　直接法を用いた多重染色模式図

3. 蛍光色素染色法

蛍光色素標識キットとして、Fluorescein Labeling Kit - NH_2, HiLyte Fluor^{TM} 555 / 647 / 750, ICG labeling Kit - NH_2(Code: LK01, LK14 / LK15 / LK16, LK31) が小社から販売されているのでご活用いただきたい。
操作上の注意点など詳細については、取り扱い説明書をご参照いただきたい。なお、キットの取り扱い説明書は小社 HP からダウンロードが可能である。

4. 蛍光顕微鏡観察例

モノクローナル抗ラット I-A 抗原抗体 (Serotec clone#MRC OX-6) 100 µg を Fluorescein Labeling Kit - NH_2 を用いて Fluorescein を標識し、ラット下顎骨を染色した。

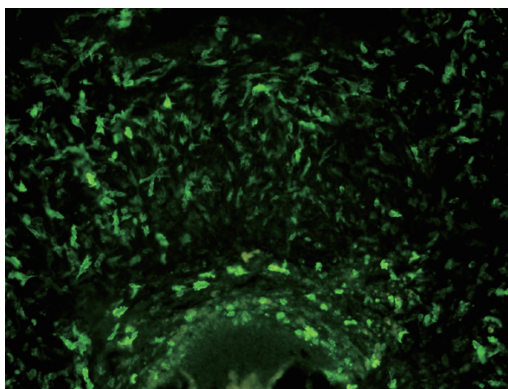



図 13 Fluorescein 標識抗ラット I-A 抗原抗体を用いて染色した
ラット下顎骨凍結切片の免疫組織染色像
（画像提供：東京医科歯科大学 大学院 医歯学総合研究科
歯髄生物学分野 楊光艶先生、川島伸之先生)

XI. 抗体への蛍光タンパク質標識方法

1. 蛍光タンパク質を標識する利点

蛍光タンパク質がフルオレセインなどの低分子の蛍光色素に比べて優れている点を以下に示す。

・蛍光タンパク質アロフィコシアニン（APC）は 1 分子あたり 6 個の発色団をもち、フィコエリスリン（R-PE）は 1 分子あたり 30 個の発色団を含んでいるので、それぞれタンパク質 1 分子あたりの蛍光強度が高い。
・励起スペクトルの幅が広いため、種々の波長で励起が可能である。
・他のタンパク質と結合しても、蛍光色素の特性が変化しない。

	Allophycocyanin	R-Phycoerythrin
読み方	アロフィコシアニン	R- フィコエリスリン
略記	APC	R-PE
由来	藍藻などの藻類に存在する水溶性の蛍光色素	
分子量	約 105,000	約 240,000
特徴	APC は He-Ne レーザーの 633 nm、または Kr イオンレーザーの 647 nm が励起に適しており、660 nm 付近の赤色の蛍光を発する。FITC や R-PE と異なり、Ar レーザーでは励起されない。	Ar レーザー 488 nm で励起が可能。 その他、キセノンランプや水銀ランプでも適当なフィルターを用いて励起が可能。570nm 以上のオレンジ色の蛍光を発する。 FITC と R-PE で二重染色すると、両者とも 488 nm で励起でき、FITC は 530 nm（緑色）、R-PE は 570 nm 以上（オレンジ色）の蛍光を発する（一励起で 2 つの蛍光を観察可能）。 内因性タンパク質による消光も起こしにくい。

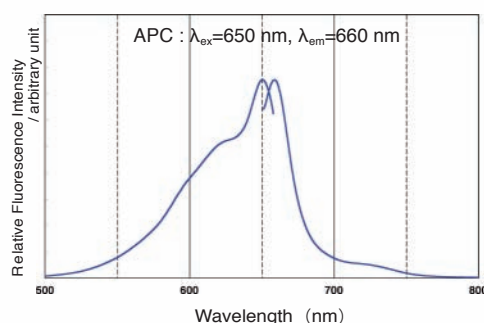



図 14　APC 励起蛍光スペクトル

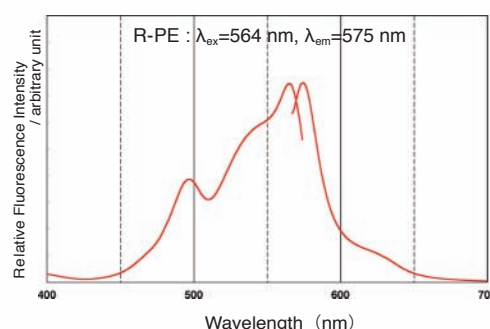



図 15　R-PE 励起蛍光スペクトル

2. 標識方法

操作上の注意点など詳細については、取り扱い説明書をご参照いただきたい。なお、キットの取り扱い説明書は小社 HP からダウンロードが可能である。

3. フローサイトメトリー例

Anti-CD179a モノクロ ― ナル抗体 HSL-96 を R-Phycoerythrin Labeling Kit-NH_2 (Code: LK23) を用いて蛍光標識した後、B-precursor ALL 細胞株 HPB-NULL を染色し、フローサイトメトリーにより二次抗体を用いた間接法と比較した。
直接法では間接法と比べ、陰性画分のバックグラウンドが低く、ほぼ同等の蛍光強度を示し、直接法で標識した抗体においても十分な検出反応を行うことが可能である。

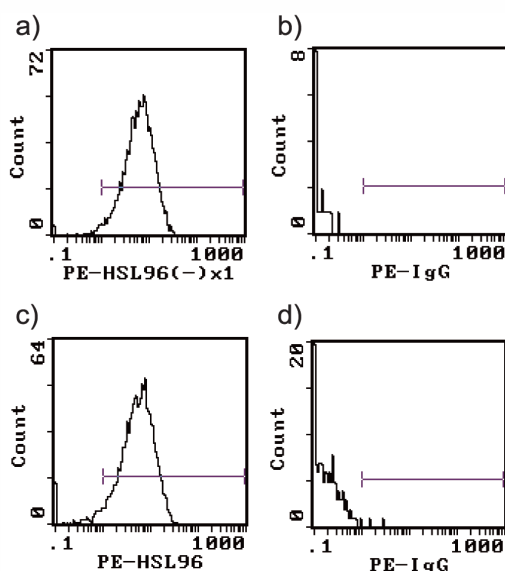



図 16
a) 直接法
PE- 標識 HSL-96(R-PE Labeling Kit - NH_2)

b) 直接法
PE- 標識 IgG コントロール

c) 二次抗体法 (間接法)
精製 HSL-96 + PE 標識二次抗体

d) 二次抗体法 (間接法)
IgG コントロール + PE 標識二次抗体

(データ提供： 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部 清河信敬先生)

(HSL96 抗体提供：東京医科歯科大学 大学院 医歯学総合研究科 免疫アレルギー学分野　烏山一先生)

4. トラブルシューティング

1) アルカリホスファターゼや蛍光タンパク質標識抗体の精製方法

アルカリホスファターゼ標識抗体や蛍光タンパク標識抗体は、アフィニティカラムによる精製で使用される酸性溶離液によって、酵素や蛍光タンパク質が失活するため、アフィニティカラムによる精製法は使用できない。したがって、これらの標識抗体を精製するには、中性条件下のゲル濾過などで精製する必要がある。ただし、抗体の分子量と未反応の酵素もしくは蛍光タンパク質の分子量には大差がないので、非常に長いカラムを使用する必要がある。また、精製の回収率等を考慮すると、ゲル濾過による精製には多くの標識抗体が必要であり、50 ～ 200 µg という少量の抗体を標識することを目的とした小社キットに適した方法とはいえない。

反応性を保持した未反応物が原因となるバックグラウンドの上昇が観察される場合は、標識操作の際、活性反応物の濃度を薄めて反応に使用することによって、バックグラウンドの上昇を抑える事ができる可能性がある。

例）R-Phycoerythrin Labeling Kit-NH_2 (Code: LK23）の場合

【取扱説明書の操作方法】

操作 5　Reaction Buffer 10 µl を NH_2-Reactive R-Phycoerythrin に加え、よく溶解する。
操作 6　NH_2-Reactive R-Phycoerythrin を含む溶液を IgG が濃縮されている Filtration Tube の膜フィルター上に加える。

上記の操作を以下のように変更する。

【バックグラウンドの上昇が観察される場合の操作方法】

操作 5　Reaction Buffer 20 µl を NH_2-Reactive R-Phycoerythrin に加え、よく溶解する。
操作 6　NH_2-Reactive R-Phycoerythrin を含む溶液 10 µl を IgG が濃縮されている Filtration Tube の膜フィルター上に加える。

XII. Fab' へのアルカリホスファターゼ標識方法

1. Fab’ フラグメントの利用について

ウサギなどの IgG をペプシンで消化すると、Fc 部分が消化されて、多くの場合抗体活性が損なわれないまま F(ab')$_2$ が得られる。F(ab')$_2$ は還元すると 2 つの Fab' に切り離される。EIA において、Fab' を酵素で標識したものは、疎水性の強い Fc 部が切り離されているので、IgG と比べて非特異吸着が低く抑えられ、かつ分子量も小さいので組織切片などにも浸透しやすいといった利点がある。このような理由から、非特異吸着を低く抑えたい実験系では、Fab’ フラグメントは IgG より好んで用いられる。Fab' は抗原結合部位の反対側のヒンジ部分に SH 基を持っているので、この SH 基を用いて酵素を標識することが可能である。

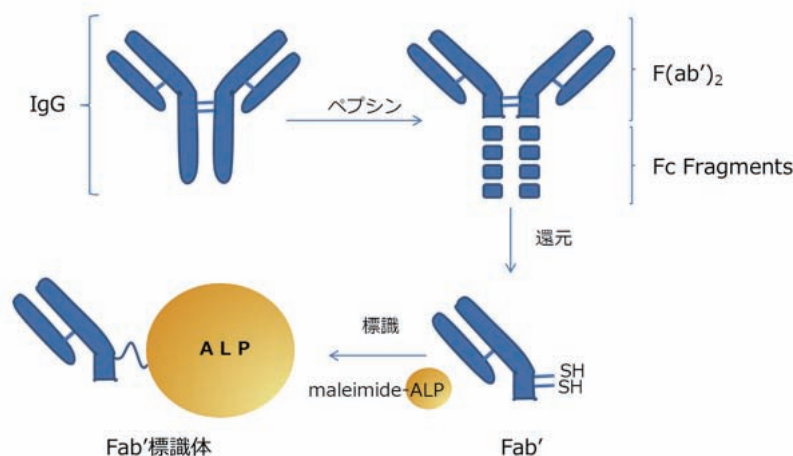



図 17　Fab' 標識体への酵素標識

2. Fab' フラグメントを利用したアルカリホスファターゼ標識法

1) $F(ab')_2$ の調製 [5]

A. 試薬 (緩衝液については緩衝液一覧を参照)

・IgG
・ブタ胃ペプシン
・緩衝液 A、緩衝液 B
・Sephacryl S-200HR(GE ヘルスケア社製)

B. 操作

(1) IgG 5 mg/0.5 ml を緩衝液 A で透析する。
(2) 透析後の試料液にブタ胃ペプシン 0.1 ～ 0.2 mg を溶解し、37°C で 15 ～ 20 時間インキュベートする。
(3) pH を 7 に調整して、Sephacryl S-200HR で、緩衝液 B を溶離液にして、流速 0.35 ml/min でゲル濾過する。
(4) $F(ab')_2$ 画分をとり、濃縮する。280 nm における吸光度を測定し、100 mg/ml のアジ化ナトリウムを 1% (v/v) 添加して保存する。
(5) MW=92,000、$\varepsilon_{280\ nm}$=1.48 g^{-1}・L・cm^{-1} を用いて濃度を算出する。
　タンパク質濃度 (mg/ml)={$A_{280\ nm}$/(1.48 × MW)} × MW=$A_{280\ nm}$/1.48 またはモル濃度 (mol/l)= $A_{280\ nm}$/(1.48×MW) に基づいて計算する。
　※ IgG のペプシンによる消化時間は、動物種により異なる。例えば、ウサギ IgG では 6 時間であるが、ヤギでは 1 ～ 2 日である。ラット・マウスの IgG 2b は 15 ～ 30 分で完全に減成され、免疫反応性は全く残らない [3]。

2) Fab' の調製 [2,5]

A. 試薬 (緩衝液については緩衝液一覧を参照)

・$F(ab')_2$
・緩衝液 C、緩衝液 D
・0.1 mol/l 2- メルカプトエチルアミン溶液 (11.36 mg の 2- メルカプトエチルアミン塩酸塩を緩衝液 D 1 ml に溶解する。)

B. 操作

(1) 0.1 ～ 3 mg の $F(ab')_2$ を含む緩衝液 C 0.45 ml に、2- メルカプトエチルアミン溶液 50 µl を添加する。
(2) 37°C で 90 分間インキュベートする。
(3) Ultrogel AcA44 カラムで、緩衝液 D を用いて流速 0.35 ml/min でゲル濾過する。
(4) Fab' 画分をとり 280 nm の吸光度を測定し、MW=46,000、$\varepsilon_{280\ nm}$=1.48 g^{-1}・L・cm^{-1} に基づいて濃度を算出する。

3）Fab' へのアルカリホスファターゼ標識 [4]

3)-1. 仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼへのマレイミドの導入

A. 試薬 (緩衝液については緩衝液一覧を参照)

・仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ
・緩衝液 E、緩衝液 F
・EMCS(製品コード : E018)
・Sephadex G-25(GE ヘルスケア社製)

B. 操作

1) アルカリホスファターゼ (2 mg)/ 緩衝液 E 0.5 ml を同じ緩衝液 E を外液にして透析する。
2) 試料液に EMCS(0.17 mg)/DMF 10 µl を添加して、30°C で 30 分間インキュベートする。
3) Sephadex G-25 カラム (1 × 45 cm) で、緩衝液 F を溶離液にしてゲル濾過し、濃縮する。
4) マレイミド量とアルカリホスファターゼ活性を測定する。

3)-2. マレイミド導入アルカリホスファターゼの Fab' への標識

A. 試薬 (緩衝液については緩衝液一覧を参照)

・マレイミド導入アルカリホスファターゼ
・Fab'
・緩衝液 D, 緩衝液 G, 緩衝液 F
・10 mmol/l 2- メルカプトエチルアミン (緩衝液 D 溶液)
・アジ化ナトリウム

B. 操作

(1) マレイミド導入アルカリホスファターゼ 1 mg(10 nmol) を緩衝液 F 0.25 ml に溶解し、Fab' 2.3 mg (50 nmol)/ 緩衝液 D 溶液 0.25 ml を混合する。
(2) 4°C で 20 時間インキュベートする。
(3) 10 mmol/l 2- メルカプトエチルアミン溶液 10 µl を添加し、Ultrogel AcA44 カラムでゲルろ過する。溶離液には緩衝液 G を用い、流速 0.35 ml/min で溶離する。
(4) アルカリホスファターゼ活性 (3)-4.) を測定し、100 mg/ml BSA と 100 mg/ml のアジ化ナトリウムをそれぞれ 1% (v/v) 添加し保存する。

3)-3. マレイミドの定量法 [5)]

EMCS (Code: E018) や GMBS(Code: G005) によりアルカリホスファターゼに導入されたマレイミドの導入数は、以下の方法で算出する。

A. 試薬 (緩衝液については緩衝液一覧を参照)
・マレイミド導入アルカリホスファターゼ
・緩衝液 C
・0.5 mmol/l 2- メルカプトエチルアミン溶液
(0.1 mol/l の 2- メルカプトエチルアミン塩酸塩溶液 10 μl と 50 mmol/l EDTA (pH6.0) 2 ml を混合し調製する。
50 mmol/l EDTA 溶液 100 ml 調製には小社 2NA(Code: N001) 1.86 g を溶解し 1 mol/l NaOH で pH6.0 に調整する。)
・5 mmol/l 4-PDS 溶液 (4-PDS (Code: P017)1.1 mg を緩衝液 B 1ml に溶解する)

B. 操作
(1) マレイミドを導入したアルカリホスファターゼ (約 10 μmol/l)/ 緩衝液 C 0.45 ml に、0.5 mmol/l 2- メルカプトエチルアミン溶液 50 μl を添加する。コントロール (全発色) として、緩衝液 C 0.45 ml に 0.5 mmol/l 2- メルカプトエチルアミン溶液 50 μl を添加したものを用意し、同様に以下の操作を行う。
(2) 30°C で 20 分間インキュベートする。
(3) 5 mmol/l の 4-PDS 溶液 20 μl 加え、30°C で 10 分インキュベートし、324 nm の吸光度を測定する。残存チオール量に相当した 4- チオピリドン量 ($ε_{324\ nm}$=19,800 M^{-1}・cm^{-1}) が生成されるため、コントロールとの吸光度差が導入されたマレイミド基量に相当する。

3)-4. アルカリホスファターゼ活性の測定

比色法および蛍光法があるが、ここでは最も一般的な比色法として、*p*NPP(4- ニトロフェニルリン酸) による方法を紹介する [2)]。

A. 試薬 (緩衝液については緩衝液一覧を参照)
・緩衝液 H
・5.5 mmol/l *p*NPP/ 緩衝液 H
・1 mol/l NaOH

B. 操作
(1) 酵素溶液を、緩衝液 H で希釈する。
(2) 酵素希釈溶液 0.5 ml を 30 ～ 37°C で 5 分間インキュベートする。
(3) 5.5 mmol/l *p*NPP/ 緩衝液 H 0.5 ml を添加する。
(4) 30 ～ 37°C で 10 ～ 100 分間インキュベートする。
(5) 1 mol/l NaOH 0.5 ml を加えて、反応を停止させ、405 nm の吸光度を測定する。予め既知濃度のアルカリホスファターゼを用いて同一法で活性を測定し、作製しておいた酵素濃度 - 吸光度の検量線から定量する。また、酵素量は、280 nm の吸光度より、$ε_{280nm}$=0.99 cm^2・mg^{-1} と MW=100,000 より算出する。
タンパク質濃度 (mg/ml)={$A_{280\ nm}$ / (0.99 × MW)} × MW=$A_{280\ nm}$/ 0.99 またはモル濃度 (mol/l)=$A_{280\ nm}$ / (0.99 × MW) に基づいて計算する。

＜緩衝液一覧＞

緩衝液の組成の一覧を下記に示す。
緩衝液 A：0.1 mol/l 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5、0.1 mol/lNaCl を含む)
緩衝液 B：0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)
緩衝液 C：0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0)
緩衝液 D：0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0, 5 mmol/lEDTA を含む)
(EDTA-2Na 塩を緩衝液作製途中で終濃度が 5 mmol/l となるよう加え、希釈してリン酸濃度が 0.1 mol/l にする。すなわち 100 ml 調製には小社 2NA(Code: N001) を 186 mg 用いる)
緩衝液 E：50 mmol/l ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH7.6、1mmol/l $MgCl_2$、0.1 mmol/l $ZnCl_2$ を含む)
緩衝液 F：0.1 mol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0、1 mmol/l $MgCl_2$、0.1 mmol/l $ZnCl_2$ を含む)
緩衝液 G：10 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8、0.1 mol/l NaCl、1 mmol/l $MgCl_2$、0.1 mmol/l $ZnCl_2$ を含む)
緩衝液 H：0.1 mol/l グリシン -NaOH 緩衝液 (pH10.3、1 mmol/l $MgCl_2$、0.25 g/l 卵白アルブミンを含む)

XIII. 関連技術紹介

1. 標識前の抗体精製法

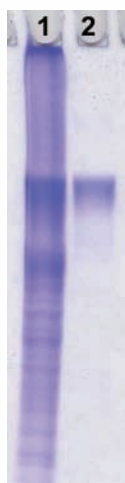
市販の抗体には、不純物混入や失活を予防するため、安定化剤が含まれていることがある。代表的な安定化剤は、アジ化ナトリウムや BSA, ゼラチンなどである。小社の標識キットでは、低分子のアジ化ナトリウムは、取扱説明書にある最初のフィルトレーションチューブ上の洗浄工程で除去が可能である。しかし、BSA やゼラチンといった高分子は、最初のフィルトレーションチューブ上の洗浄工程で除くことはできない。このような安定化剤が含まれる抗体標品を標識する場合、抗体への標識を阻害するので、予め安定化剤を除去する必要がある (BSA 含量が 1% 程度でも、除去する必要がある)。

1)BSA の除去方法

(1) 試薬
IgG Purification Kit-A(もしくは G) (Code: AP01 もしくは AP02)
市販の抗体 200 µg
(2) 精製方法
IgG Purification Kit 添付の取扱説明書に従って、精製を行う。

2) ゼラチンの除去方法

A, B いずれかの方法で除去する。

A. コラーゲナーゼ（Collagenase）によるゼラチン分解

(1) 試薬
コラーゲナーゼ（Sigma, #C7826）3.5 CDU/ml 希釈溶液
IgG Purification Kit-A(もしくは G) (Code: AP01 もしくは AP02)
市販の抗体 200 µg

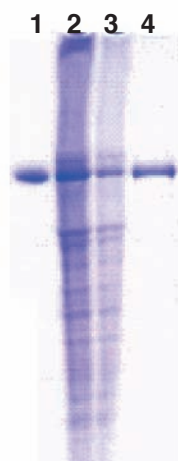
(2) 精製方法
・0.2% ゼラチンを含む 200 µg/ml IgG 溶液 1 ml に酵素処理用緩衝液 (100 mmol/l HEPES, pH7.4, 0.36 mmol/l $CaCl_2$ 含有) 420 µl と酵素処理用緩衝液で調製した 3.5 CDU/ml コラーゲナーゼ希釈溶液 80 µl を加えて混合する。
・37°C、3 時間インキュベートした後、IgG Purification Kit-A(もしくは G) を用いて IgG を単離する。

※ IgG Purification Kit では、抗体を固定化担体に保持させる際の抗体溶液量を一回当たり 200 µl としている。しかし、上記操作でコラーゲナーゼ処理した抗体溶液量は、約 1.5 ml となるため、IgG を担体に保持させる操作を 8 回（200 µl × 7, 100 µl × 1）に分けて行う。

※上記の方法で得られる抗体の回収率：45 ～ 50%

1 2

図 18 ゼラチン除去精製前後の SDS-PAGE
1: ゼラチン含有 IgG 溶液
2: 精製後の IgG 溶液

B. 300K 限外ろ過チューブを用いたゼラチン除去

(1) 試薬
300K フィルトレーションチューブ
（Pall 社 ナノセップ遠心ろ過デバイス（製品コード：OD300C33）
IgG Purification Kit-A(もしくは G) (Code: AP01 もしくは AP02)
市販の抗体 200 µg
(2) 精製方法
・0.1% ゼラチンを含む 200 µg/ml IgG 溶液 1 ml を 300K フィルトレーションチューブ 2 本に分けて限外ろ過を行う（200 µl × 2, 100 µl × 1, 13,500 x *g*）。
・その後、回収溶液 500 µl を IgG Purification Kit-A(もしくは G) を用いて IgG を単離する。
※回収溶液 500 µl に対し、IgG Purification Kit の Washing Buffer 50 µl を添加し、精製を行う。
ゲルへの吸着操作は 5 回繰り返す。
※上記の方法で得られる抗体の回収率：35 ～ 45%

1 2 3 4

図 19 ゼラチン除去精製前後の SDS-PAGE
1: IgG
2: ゼラチン含有 IgG 溶液
3: 300K 限外濾過のみの IgG 溶液
4: 300K 限外濾過 + IgG Purification Kit - G で精製後の IgG 溶液

XIV. 関連製品

【IgG 標識キット】

製品名	標識できるもの	品コード	検出 [λ_{ex}, λ_{em}]	備考
Biotin Labeling Kit-NH_2	ビオチン	LK03	(アビジン)	**初めてビオチン標識をする方におすすめ**
Biotin Labeling Kit-SH	ビオチン	LK10	〃	アミノ基標識で上手くいかない系で使用すると感度改善が期待できる場合もある
Peroxidase Labeling Kit-NH_2	酵素	LK11	(基質)	**初めて HRP 標識する方におすすめ**
Peroxidase Labeling Kit-SH	酵素	LK09	〃	アミノ基標識で上手くいかない系で使用すると感度改善が期待できる場合もある
Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH_2	酵素	LK12	〃	**初めて ALP 標識する方におすすめ**
Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH	酵素	LK13	〃	アミノ基標識より高感度
Fluorescein Labeling Kit- NH_2	蛍光色素	LK01	蛍光 [500, 525]	**初めて蛍光標識する方におすすめ**
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit-NH_2	蛍光色素	LK14	蛍光 [555, 570]	Cy3 と類似した蛍光特性を持つ色素
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit-NH_2	蛍光色素	LK15	蛍光 [655, 670]	Cy5 と類似した蛍光特性を持つ色素
HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit-NH_2	蛍光色素	LK16	蛍光 [760, 780]	Cy7 と類似した蛍光特性を持つ色素
ICG Labeling Kit-NH_2	蛍光色素	LK31	蛍光 [774, 805]	*in vivo* イメージング用蛍光色素
Allophycocyanin Labeling Kit-NH_2	蛍光タンパク質	LK21	蛍光 [650, 660]	647 nm(Kr イオンレーザー) で励起可能
Allophycocyanin Labeling Kit-SH	蛍光タンパク質	LK24	〃	アミノ基標識で上手くいかない系で使用すると感度改善が期待できる場合もある
R-Phycoerythrin Labeling Kit-NH_2	蛍光タンパク質	LK23	蛍光 [564, 575]	488 nm(Ar レーザー) で励起可能 蛍光色素より高感度
R-Phycoerythrin Labeling Kit-SH	蛍光タンパク質	LK26	〃	アミノ基標識で上手くいかない系で使用すると感度改善が期待できる場合もある

【IgG 精製キット】

IgG Purification Kit - A	AP01	抗体の種に応じて回収率の高い方を選択する
IgG Purification Kit - G	AP02	抗体の種に応じて回収率の高い方を選択する

【ビオチン化試薬】

製品名	対象官能基	品コード	備考
Biotinylation Kit (Sulfo-OSu)	アミノ基	BK01	1 ～ 5 mg のタンパク質や抗体をビオチン化するのに適したキット
Biotin-OSu		B304	AC 基の数でスペーサー長を調整する。 水に溶けにくいので、DMSO などの有機溶剤に溶解後、緩衝液で希釈する。
Biotin-AC_5-OSu		B305	
Biotin-$(AC_5)_2$-OSu		B306	
Biotin-Sulfo-OSu		B319	AC 基の数でスペーサー長を調整する。 水に溶け易いので、緩衝液で溶解可能。 分解しやすいので、用時調製する。
Biotin-AC_5 Sulfo-OSu		B320	
Biotin-$(AC_5)_2$ Sulfo-OSu		B321	
Biotin-PE-maleimide	SH 基	B300	AC 基の数でスペーサー長を調整する。
Biotin-PEAC$_5$-maleimide		B299	

製品名	対象官能基	品コード	備考
Biotin-hydrazide	アルデヒド基 カルボン酸	B303	アルデヒド基、カルボキシル基へのビオチン導入剤、AC 基の数でスペーサー長を調整する。
Biotin-AC_5-hydrazide		B302	
Biotin-$(AC_5)_2$-hydrazide		B301	

【発色基質】

製品名	対象酵素	品コード	備考
DAB	HRP	D006	過酸化水素、HRP 存在下で免疫染色などに使用。
TMBZ		T022	TMB と同一構造。水溶性は低い。過酸化水素、HRP 存在下で青緑色に発色。
TMBZ・HCl		T039	TMBZ の塩酸塩タイプ。水溶性は高い。
SAT-3		S302	水溶性が高く、TMB と同様に使用することができる。

【Fab' 標識関連試薬】

EMCS	E018	マレイミド基導入試薬※
GMBS	G005	マレイミド基導入試薬※
2NA(EDTA・2Na)	N001	キレート剤。SH 基安定化の目的で使用。
4-PDS	P017	SH 基比色定量試薬

※小社では他にもスペーサー長の異なるマレイミド導入試薬をご用意している。詳しくは HP をご参照いただきたい。

XV. 参考文献

1) J. Hirota, S. Shimizu, *Bull. Natl. Inst. Anim. Health*, **2005**, *111*, 37.
2) 石川栄治 , 河合忠 , 宮井潔 , 酵素免疫測定法 第 3 版 , 医学書院 , **1987**.
3) P. Tijssen 著 , 石川栄治訳 , 生化学実験法 11 エンザイムイムノアッセイ , 東京化学同人 , **1989**.
4) P. Cuatrecasas, I. Parikh, *Biochemistry* , **1972**, *11*(12), 2291.
5) E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, T. Ueno, *J. Immunoassay* , **1983**, *4* , 209.

< 本文に関するお問い合わせ先 >

株式会社同仁化学研究所
マーケティング部
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
熊本テクノリサーチパーク　〒 861-2202
Tel:0120-489-548, Fax:0120-021-557
E-mail: info@dojindo.co.jp, URL: www.dojindo.co.jp